

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/75



[12] 发明专利说明书

C12N 9/28 C12N 1/21

C12R 1/125

[21] ZL 专利号 98804531.1

//C12N9/56

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1142280C

[22] 申请日 1998.4.24 [21] 申请号 98804531.1

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

[30] 优先权

代理人 巫肖南

[32] 1997.4.26 [33] GB [31] 9708452.9

[86] 国际申请 PCT/GB98/01051 1998.4.24

[87] 国际公布 WO98/49328 英 1998.11.5

[85] 进入国家阶段日期 1999.10.26

[71] 专利权人 纽卡斯尔大学

地址 英国泰恩河畔纽卡斯尔

共同专利权人 谱维信公司

[72] 发明人 科林·R·哈伍德 基思·史蒂文森

斯蒂恩·乔根森 克里斯蒂娜·詹森

蒂纳·克里斯滕森

审查员 徐佳凌

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 12 页

[54] 发明名称 改进的蛋白质原核表达

[57] 摘要

本发明涉及一种新的原核表达系统和由其表达的蛋白质。已表明枯草芽孢杆菌基因组中的 wprA 基因的调节的表达或改变能够增强选择的天然的，异源的或重组的多肽的分泌。这种改变提供了一种方法，使得与携带野生型拷贝的 wprA 基因的菌株相比能够增加分泌多肽的产量。

ISSN 1008-4274

种特征曾认为是有利的。然而，实际上这种优点并非系统的一般特征，因为在很多情况下蛋白质保持不可溶沉淀物状态，只有通过使用强离液剂才能释放到溶液中。这就出现一个问题，如果目的蛋白特别不稳定并从而变性失去生化或生物活性。其次，外源蛋白质在大肠杆菌中的表达导致这些5 蛋白质通过有效的蛋白水解系统快速降解。因此从大肠杆菌细菌中分离完整重组蛋白质时出现困难。

已经改造了大肠杆菌菌株(TOPP 系列, BL 21)使得通常在传统实验室大肠杆菌菌株中难以表达的重组蛋白质能够表达。但是这些改造大肠杆菌菌株总是不象传统实验室大肠杆菌菌株那样易于除去生物活性，因而需要比10 正常所需更高的防范等级。

显然需要确定替代的原核宿主细胞和开发方法，以促进可溶的，完整的和具生物学活性的蛋白质的生产。然而，要注意潜在的原核宿主细胞的数量是巨大的。

## 15 发明内容

为了产生新的蛋白质表达系统，我们选择遗传改造的枯草芽孢杆菌作为例子提供一种克服了与现有系统产量相关的问题的表达系统。我们把注意力集中于提供一种细菌表达系统，它能够产生并理想地分泌蛋白质(天然和/或异源和/或重组的)到培养物中，因为这种系统由于缺少污染的内源细菌蛋白质和其它大分子而能够纯化制造的蛋白质。20

鉴定了多种编码分泌的蛋白酶的枯草芽孢杆菌基因。例如但不限于编码胞外蛋白酶的 aprE, nprE, bpf, mpr, epr, nprB 和 vpr 枯草芽孢杆菌基因。这些蛋白酶分泌到培养基中并且它们从枯草芽孢杆菌基因组中的缺失降低到低于野生型菌株胞外蛋白酶活性的 1%。尽管如此，实验证据显示25 缺少胞外蛋白酶的枯草芽孢杆菌菌株仍表现通过蛋白水解降解而显著降低分泌蛋白的产生。

一种细胞壁相关蛋白酶的鉴定使我们开始研究它在枯草芽孢杆菌中天然和/或异源和/或重组蛋白的表达和分泌中是否起作用以及蛋白酶是否在确定分泌蛋白产生中起重要作用。

30 细胞壁蛋白酶 A(wprA)基因编码一个 96kDa 的多肽，该多肽包括信号肽，前肽和蛋白酶，由于合成和输出形成两种细胞壁结合蛋白质，CWBP 23

和 CWBP 52(图 1)。CWB P 52 多肽具有蛋白酶活性，能被一种丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 抑制。wprA 的缺失不导致任何显著的生长速率，细胞形态，芽胞形成或运动性方面的表型。

wprA 有下列特征：多肽是细胞壁相关的并且在指数期和稳定生长期表达的。

我们决定研究 wprA 缺失菌株的表型，特别是异源蛋白质的分泌。

使用同源重组，我们得到的菌株，其中将来自枯草芽孢杆菌基因组的 wprA 基因置于可诱导启动子的控制下。如上所述，这种 wprA 可控制菌株没有明显的表型，甚至在缺乏诱导剂时亦是如此。然而令人惊奇的是，当将来自地衣芽孢杆菌 (AmyL) 的天然杆菌性的模式蛋白  $\alpha$ -淀粉酶的产量与野生型不含 wprA 菌株相比时，在指数生长末期测定的  $\alpha$ -淀粉酶的量大约增加 25%，参看图 2A。在延长培养后产量进一步增加到 41% (图 3)。与野生型 wprA 菌株相比，敲除 wprA 基因亦导致改造的  $\alpha$ -淀粉酶，AmyLQS 50.5 的产量增加 (图 2B)。这提示在枯草芽孢杆菌中关闭或缺失 wprA 基因显著增强分泌的同源和异源蛋白质的产生。

wprA 基因在天然，异源或重组蛋白质的分泌中的重要性亦通过试图确定参与分泌途径的其它基因的实验得以显示。我们使用了用表达嵌合  $\alpha$  淀粉酶基因的载体转化的枯草芽孢杆菌菌株 CJ 278，对于嵌合  $\alpha$  淀粉酶基因和枯草芽孢杆菌的构建的细节，参看材料和方法。与表达野生型  $\alpha$  淀粉酶的野生型菌株分泌水平相比，这种菌株表现降低嵌合  $\alpha$ -淀粉酶分泌。我们使用了用 mini-Tn 10 传递载体 pIC 333 的转座子诱变。这种转座子在枯草芽孢杆菌基因组中的整合是随机的。筛选过程包括鉴定表现嵌合  $\alpha$ -淀粉酶增强分泌的整合突变体。对这样鉴定的突变菌株进一步分析，是通过从突变菌株中拯救质粒 DNA，将转座子整合位点周围的侧翼区测序，从而确认转座子整合的枯草芽孢杆菌染色体区域。对来自转座子突变体 TK 108 拯救的质粒测序显示，转座子插入到 wprA 基因的 2059 位点。

因此显然缺乏 WprA 会促进自枯草芽孢杆菌的天然，异源或重组蛋白的分泌。

由此，本发明的目的是开发一种在原核表达系统中表达重组蛋白的方法，使得产生具生物活性形式高浓度的多肽。

本发明的进一步目的是开发原核表达系统，使重组蛋白分泌到培养液

中，以促进保持生物活性的完整重组蛋白的纯化。

根据本发明的第一方面，提供了通过缺失和/或插入和/或突变和/或取代改变了 wprA 基因或其相应启动子的细菌菌株，从而阻止了所述基因产物的产生或基因产物的非功能程度能够促进使用该菌株产生的天然，异源或 5 重组蛋白。

本发明的一个优选实施方案中，所述细菌菌株在上述改变前对该 wprA 基因是野生型的。

在进一个优选实施方案中，所述菌株是一种革兰氏阳性细菌菌株。

在又一个优选实施方案中，所述细菌菌株属于芽胞杆菌属。

10 此处术语细菌菌株包括任何细菌菌株，但理想地是一种革兰氏阳性细菌菌株并且更理想但非限制的，是芽胞杆菌属细菌菌株。

对本领域技术人员而言下面所述是显然的，当需产生异源蛋白质时，将所述细菌菌株转化从而包括编码至少一种选择的天然和/或异源和/或重组蛋白质的 DNA。

15 在本发明优选实施方案中，处理所述菌株使至少一部分 wprA 基因缺失。理想地缺失了显著量的该基因，但在本发明的某些方面，缺失了前序列或其部分，或可选择的地缺失了原序列或其部分，或可选择的地缺失了丝氨酸蛋白酶序列或其部分。或者，缺失该基因选择的可替代部分或缺失选择部分的组合。

20 在本发明的另一个实施方案中，在至少一个选择位点向 wprA 基因中插入遗传物质，以阻止该基因表达或至少部分的功能蛋白质产物的合成。

另外，在所述基因中可提供至少一个选择性点突变，以阻止蛋白质的合成或阻止该基因表达。例如，但不限于，改变阅读框以编码终止密码子从而阻止功能蛋白质的合成。

25 在本发明又一个优选实施方案中通过修饰表达调控序列，理想地是一种启动子从而使启动子对特定信号起反应来改变所述 wprA 基因，例如，可将 wprA 基因置于可诱导启动子的控制下，使 wprA 基因产物可选择性控制。

在本发明一优选实施方案中，细菌菌株属于芽胞杆菌属并且理想地是枯草芽胞杆菌或其近亲诸如解淀粉芽孢杆菌，地衣芽孢杆菌和嗜热脂肪芽 30 孢杆菌。

需注意的是 wprA 基因编码具有由于它所衍生的氨基酸序列的特定结构

域的蛋白质。如 Margot 和 Karamata 的精确定义 (Microbiology 1996 142 3437-3444)，可将该多肽分为信号肽，前肽和蛋白酶多肽。信号肽参与将 wprA 基因产物靶向于穿细胞膜运输所需的分泌装置。前肽看来是一种伴侣型分子，参与将 CWBP 52 蛋白质折叠和成熟至生物活性形式。前肽是稳定的并可能行使其它重要功能。蛋白酶多肽将需要前和原序列的存在才能有效靶定和有效行使功能。

依据本发明的第二方面，提供了一种细菌菌株，优选地是芽胞杆菌属，理想地是枯草芽胞杆菌菌种，至少具有显示于图 1 的从核酸碱基对 + 154 至 + 247 (包括 + 154 和 + 247) 的序列的部分或同源基因相应部分的缺失。

在一优选实施方案中，提供了缺失了 WprA 前体蛋白编码序列的编码信号肽的部分 wprA 基因的枯草芽胞杆菌菌株。

依据本发明的第三个方面，提供了优选地属于芽胞杆菌属并且理想地是枯草芽胞杆菌的细菌菌株，其至少具有包括显示于图 1 的从核酸碱基对 + 154 至 + 1392 (包括 + 154 和 + 1392) 的序列的部分或同源基因相应部分的缺失。

在一个优选实施例中，所述细菌菌株可能另外地或可选择地通过至少显示于图 1 的从 + 247 至 + 1392 的 DNA 序列的部分或同源基因相应那部分缺失得以修饰。

在进一步优选实施方案中所述枯草芽胞杆菌菌株缺失了部分 wprA 基因，该基因至少编码部分 CWBP 23 多肽。

依据本发明的第四方面，提供了一种细菌菌株，优选地是芽胞杆菌属，理想地是枯草芽胞杆菌菌种，至少具有包括显示于图 1 的从核酸碱基对 + 1392 至 + 2835 (包括 + 1392 和 + 2835) 部分的序列或同源基因相应部分的缺失。

在一优选实施方案中，提供了枯草芽胞杆菌菌株，其缺失了至少编码部分 CWBP 52 多肽的部分 wprA 基因。

在本发明进一步优选实施方案中，所述细菌菌株至少缺失了显示于图 1 的从核酸碱基 + 247 至 + 2835 的部分序列。

在本发明另一优选的实施方案中，提供一种缺失部分 wprA 基因的枯草芽胞杆菌菌株，该基因编码所述前肽 (CWBP 23) 或丝氨酸蛋白酶 (CWBP 52) 中

抗性基因和 pUC8 复制起点，便能在大肠杆菌中复制。将质粒 pIC 333 转化到菌株 CJ 278 并将红霉素抗性转化体接种到补充有 0.4% 葡萄糖和壮观霉素 (120 微 g/ml) 的 TY 培养基中，在 28°C 培养过夜。将过夜培养物在补充有 0.4% 葡萄糖和壮观霉素 (120 微 g/ml) 的 TY-培养基中稀释为 1/100。培养 5 小时后将温度切换到 37°C (限制性温度) 再培养 4 小时。将小份培养物在补充有 0.4% 葡萄糖，0.01M 磷酸盐 pH7，0.2% 木糖和 120 微 g/ml 壮观霉素的 LB-支链淀粉 (与 Cibacron 红偶合) 平板上涂布并在 37°C 培养过夜。具有明显较大晕圈的克隆，表示较高量的  $\alpha$ -淀粉酶的分泌，以 1/150 的频率出现。其中一个这种转座子突变体，比亲本菌株形成更大的淀粉降解晕圈，10 是菌株 TK108。

利用转座子中的 pUC 复制起点，拯救 mini-Tn10 转座子及自菌株 TK108 其侧翼区。将 TK108 染色体用 EcoRI 完全消化，并用 T4DNA 连接酶重新连接。将连接混合物转化到大肠杆菌 SJ2 (Diderichsen et al, 1990. J. Bacteriology 172, 4315-4321)，筛选壮观霉素抗性。将来自壮观 15 霉素抗性转化体的质粒 DNA 用于 DNA 测序。通过双脱氧链终止法 (Sanger et al 1997) 并使用 mini-Tn10 特异引物：5'-CCAATACGCAAACGCCCTCTC-3' 和 5'-TAGTGACATTGCATGCTTC-3' 测定了 DNA 序列，该引物分别相应于 mini-Tn10 转座子序列的位置 137-117 和 2181-2200。

从转座子突变体 TK108 获得的质粒序列表明该转座子在位置 2059 插入 20 wprA 基因。

## 结果和讨论

显然需要开发制造天然的，异源的或重组蛋白质的有效替代方法。明显的并非所有异源蛋白质均以可溶的具生物活性的形式产生，因此不断设计出促进此类蛋白质产生的方法。25

我们采取的方法是开发芽孢杆菌属和其近亲作为天然和异源和重组蛋白产生的替代宿主。由于它们易于在分批培养基中生长，快速的细胞分裂以及进一步能够将蛋白质高浓度分泌到培养基中，因而这些细菌比其它菌种有相当的优势。另外我们决定集中开发一种表达系统，能够向培养液中 30 分泌可溶性蛋白，从而有利于将这种蛋白从污染的内源性细菌蛋白质和其它大分子中纯化出来。这种方法的一个大问题是许多细菌系统活跃分泌蛋

白酶到培养基中，在细菌细胞的邻近环境中降解蛋白质。已经改造了一些枯草芽孢杆菌菌株，从细菌染色体缺失这些基因从而降低由于蛋白酶活性造成的蛋白质损失。但是，这样仍会导致完整蛋白的产量降低，其中一个原因在于胞内蛋白酶释放到生长培养基中，即由于具有胞外蛋白酶多重缺陷的菌株易于裂解从而将细胞内含物释放到周围的生长培养基中。

另外，我们采用脉冲-追踪标记实验确定分泌的蛋白质发生蛋白酶解的位置。可以观察到释放到培养基中的成熟 AmyL 的量（一种模式分泌蛋白）随时间增加直到达到一稳定水平。该水平只有合成的总 AmyL 量的大约 25%，与全培养物样品中保留的 AmyL 量一致。这意味着起始合成的 AmyL 的 75% 降解了。通过确定每个时间点加入追踪溶液后保持与细胞结合的 AmyL 的比例，通过从全培养样品观测量中减去释放的 AmyL 量，可以确定 AmyL 降解发生在细胞结合的位置且在加入追踪溶液 7 分钟内，图 6。这些数据提示观测到的 AmyL 的降解发生在穿膜运输过程中或其后短时间内，并且在细胞相联系的位置。

枯草芽孢杆菌的 *wprA* 基因编码细胞壁结合的丝氨酸蛋白酶。该 *wprA* 基因产物由帮助蛋白酶定位于分泌装置的前导序列（信号肽），产生极有可能具有伴侣型活性的稳定 23kDa 蛋白质产物的原序列和 52kDa 丝氨酸蛋白酶组成。我们改造的 *wprA* 基因是将其置于 IPTG 可诱导的启动子元件控制之下。这使得 *wprA* 的表达简单的通过生长培养基中 IPTG 的存在或缺失而处于严格调节之下。当将显示降低的  $\alpha$ -淀粉酶产生的枯草芽孢杆菌菌株用 mini Tn10 转座子随机诱变时，确认出具有增强  $\alpha$ -淀粉酶产生的整合突变体。拯救的 Tn10 DNA 序列测定揭示整合位点是 *wprA* 基因。我们亦制造出一枯草芽孢杆菌菌株，其通过遗传改造为从染色体中完全缺失了 *wprA* 基因。

我们用嵌合  $\alpha$ -淀粉酶基因转化了野生型枯草芽孢杆菌菌株 DN1885 *xy1R::pKS405B* 以及用野生型  $\alpha$ -淀粉酶转化了菌株 DN1885 *xy1R::pKS408* 并用包含于质粒 pM2wprAFP 的 IPTG 可诱导启动子置换了 *wprA* 启动子序列（参看材料和方法）。

在含有或缺乏 10mM IPTG 的枯草芽孢杆菌培养物中评价了分泌的野生型  $\alpha$ -淀粉酶的活性。使用由其野生型启动子表达的 *wprA* 的培养物作为对照培养物。按培养物光密度测定，图 2A 表明枯草芽孢杆菌菌株的生长速度和动力学不受 *WprA* 蛋白质缺失的（未加 IPTG）显著影响。但是，缺乏 10mM

IPTG 时, 与由其野生型启动子表达 *wprA* 基因的野生型菌株相比, 培养物中  $\alpha$ -淀粉酶活性大约增长 25% (图 2A)。图 2B 表明对嵌合淀粉酶产生的相当的效果。

亦评价了野生型或 IPTG-可诱导 *wprA* 基因的枯草芽孢杆菌稳定期培养物中天然  $\alpha$ -淀粉酶的产量(图 3)。将菌株培养大约 39 个小时, 此时的培养物已处于稳定期大约 30 小时。缺乏 IPTG 时, 与由其野生型启动子表达 *wprA* 的菌株相比培养物中  $\alpha$ -淀粉酶的产量增加了大约 40%。与此相反, 存在 IPTG 时 (*wprA* on) KS408*wprA*::pMutin 2  $\alpha$ -淀粉酶的产量较低并且转到稳定期时  $\alpha$ -淀粉酶的产出是 KS408 的 95%。

另外, 将菌株在丰富工业型培养基中延时分批发酵培养时, 缺乏 *WprA* 蛋白时  $\alpha$ -淀粉酶活性增加大约 78%。

这些资料证明 *wprA* 的表达显著影响释放的  $\alpha$ -淀粉酶的产量。

我们还使用联合脉冲-追踪和免疫沉淀技术研究 AmyL 在 KS408 和 KS408*wprA*::pMutin 2 中的分泌动力学。将培养物培养至指数期 ( $OD_{600} \sim 0.6$ ) 并用 L- ( $^{35}S$ ) 甲硫氨酸脉冲追踪。免疫沉淀和随后的 SDS-PAGE 之后, 通过放射自显影看到前体和成熟形式的 AmyL, 图 4。对于 KS408, AmyL 前体至成熟形式的过程迅速; 在脉冲后立即取样时 (0 分钟), 脉冲中合成的总 AmyL (前体 + 成熟的) 只有 27% 是前体形式, 图 4。追踪 5 分钟后过程完成, 所有的  $\alpha$ -淀粉酶处于成熟形式。全培养样品 (细胞 + 生长培养基) 中成熟 AmyL 的量在 1 分钟时达到峰值, 随后降低直到大约 25% 最大检测值的稳定水平, 显示穿过细胞质膜运输时或其后短时间内新合成  $\alpha$ -淀粉酶的显著损失。

通过采用突变体筛选确定显示增强的嵌合  $\alpha$ -淀粉酶分泌的突变菌株亦证实了 *WprA* 蛋白质与枯草芽孢杆菌蛋白质分泌有关。将 mini-Tn10 转座子随机整合到细菌基因组 DNA, 如果转座子未整合到关键基因, 这样会产生插入突变。与野生型控制菌株相比, 突变菌株 TK108 显示增加的嵌合  $\alpha$ -淀粉酶分泌。从 TK108 基因组 DNA 回收 mini-Tn10 传递载体并将围绕载体的侧翼区测序, 确定整合位点。转座子整合于 *wprA* 基因的 2059 位置。通过测定在淀粉琼脂平板上与 CJ278 (野生型) 比较的 TK108 周围产生的晕圈监测到破裂的枯草芽孢杆菌菌株 TK108 显示提高的  $\alpha$ -淀粉酶分泌。

总的来说, 我们表明关闭或损坏或缺失单拷贝 *wprA* 基因能显著提高培养基中来自枯草芽孢杆菌的天然的, 异源的或重组蛋白质的产量。重要的

是，枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶仍旧积极地分泌到培养基中，表明分泌  $\alpha$ -淀粉酶增加的产量的生产主要贡献因素在于除去了由 wprA 基因编码的细胞壁结合蛋白酶。

表 2

5  $\alpha$ -淀粉酶的相对产量是野生型和 wprA IPTG 可诱导的枯草芽孢杆菌菌株。

B. subtilis DN1885 xylR::pKS408	B. subtilis DN1885 xylR::pKS408 wprA::pM2wprA <sup>FP</sup>
100	178